

PAT-NO: JP403099264A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 03099264 A
TITLE: ANALYSIS OF PROTEIN AND POLYPEPTIDE
PUBN-DATE: April 24, 1991

INVENTOR-INFORMATION:

NAME **COUNTRY**
YOSHIOKA, MASANORI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME **COUNTRY**
ISE KAGAKU KOGYO KK N/A

APPL-NO: JP01234724
APPL-DATE: September 12, 1989

INT-CL (IPC): G01N030/90 , G01N030/94

US-CL-CURRENT: 436/86

ABSTRACT:

PURPOSE: To achieve a reduction in a analyzing time by dansylation of amino acid AA isolated by Edman degradation conducted several times on a thin porous glass layer.

CONSTITUTION: Glass composed of SiO₂, 45-70, B₂O₃ 8-30, CaO 8-25, Al₂O₃ 5-15, Na₂O 3-8, K₂O 1-5, Na₂O + K₂O 4-13 and MgO 0-8 (all % by weight) undergoes a thermal treatment and a phase splitting is performed based on Ba₂O₃ and CaO to obtain a thin porous glass layer by removing the phases resulted by dissolution. N spots of protein or polypeptide are applied on the glass thin layer, at (i)th (i=1-N) spotting, 2-mercaptoethanol, phenyl isocyanate and trifluoroacetate are spotted sequentially and Edman's decomposition is conducted (i) times to isolate AA. Then, dansylation of AA is performed by the total spotting and subsequently, a development is performed on the above glass to detect AA as dansyl amino acid. This enables determination of a primary structure of protein or the like simply in a short time.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A) 平3-99264

⑬ Int. Cl.⁹G 01 N 30/90
30/94

識別記号

庁内整理番号

7621-2G
7621-2G

⑭ 公開 平成3年(1991)4月24日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑮ 発明の名称 蛋白質、ポリペプチドの分析法

⑯ 特 願 平1-234724

⑰ 出 願 平1(1989)9月12日

⑱ 発 明 者 吉 岡 正 則 京都府八幡市橋本栗ヶ谷42-3 メロディーハイム希望ヶ丘210号

⑲ 出 願 人 伊勢化学工業株式会社 東京都中央区八重洲2丁目7番12号

⑳ 代 理 人 弁理士 梅村 繁郎 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

蛋白質、ポリペプチドの分析法

2. 特許請求の範囲

(1) 多孔質ガラス薄層上に蛋白質或はポリペプチドをN個スポットし、第i番目($i=1\sim N$)のスポットでエドマン分解をi回行なって蛋白質或はポリペプチドを分解してアミノ酸を遊離させ、ついで全スポットでアミノ酸をダンシル化した後、上記ガラス上で展開を行ない、アミノ酸をダンシルアミノ酸として検出する蛋白質、ポリペプチドの分析法。

(2) エドマン分解は2-メルカプトエタノール、フェニルイソシアネート及びトリフルオロ酢酸を順次スポットすることによって行なう請求項1記載の分析法。

(3) 多孔質ガラスは SiO_2 45～70 wt%、 B_2O_3 8～30 wt%、 CaO 8～25 wt%、 Al_2O_3 5～15 wt%、 Na_2O 3～8 wt%、 K_2O 1～5 wt%、 $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$ 4～13 wt%、 MgO 0～

8 wt%、又は SiO_2 45～70 wt%、 B_2O_3 8～30 wt%、 CaO 8～25 wt%、 Al_2O_3 5～15 wt%なる組成を有するガラスを熱処理して B_2O_3 、 CaO を主体とする相を分相せしめ、この相を溶解除去することによって得られるものである請求項1又は2記載の蛋白質、ポリペプチドの分析法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は蛋白質、ポリペプチドの分析法に関する。

(従来の技術)

蛋白質或はポリペプチド(蛋白質等と略称)は、多数のアミノ酸(AAと略称)が脱水反応によって結合した構造を有する。

蛋白質等の一次構造の解析(本解析と言う)を行なうためには、蛋白質等を分解して、AAを末端のものから逐次遊離し、薄層クロマトグラフィ(TLC)等で分離、定量する。

蛋白質等の分解には、フェニルイソシアネート

(PITC) 及びトリフルオロ酢酸 (TFA) を用いたエドマン分解法が広く用いられている。

(発明が解決しようとする課題)

従来技術は、次のような問題点を有する。

エドマン分解を自動化したシーケンサーが市販され普及している。この方法 (自動法という) では、PITC により蛋白質等の N-端の AA 残基をフェニルチオヒダントイン (PTH) - AA として逐次遊離し、遊離 PTH-AA をガスクロマトグラフィー、或は高速液体クロマトグラフィーで分離、定量する。

自動法によるときは、N 端から多数個の AA の配列を決定することができるが、シーケンサーが極めて高価であるのみならず、操作に熟練を要し、手間と時間のかかるという問題点があった。

手動的に試験管内で蛋白質等をエドマン分解し、第 1 の N-端の AA 残基を遊離させ、ついで第 2 の N-端となる AA 残基をダンシルクロライド (DNS-Cl) でダンシル化 (DNS 化) し、加水分解して DAN-AA を遊離させ、ポリ

アミドの TLC で分離固定する方法も試みられている。この方法も、操作に熟練を要し、手間と時間にかかるだけでなく、通常 N-端から数個の AA の配列が決められるのみであるという問題点を有する。

本発明は、上述した従来技術の有する上記問題点を解消し、高価な装置を用いることなく、熟練を要することなく、短時間で簡単に蛋白質等の一次構造の解析を可能ならしめる蛋白質、ポリペプチドの分析法を提供することを目的としている。

(課題を解決するための手段)

上記目的を達成するために本発明においては、多孔質ガラス薄層上に蛋白質或はポリペプチドを N 個スポットし、第 i 番目 ($i = 1 \sim N$) のスポットでエドマン分解を i 回行なって蛋白質或はポリペプチドを分解してアミノ酸を遊離させ、ついで全スポットでアミノ酸をダンシル化した後上記ガラス上で展開を行ないアミノ酸をダンシルアミノ酸として検出することによって蛋白質、ポリペプチドを分析する。

又エドマン分解を 2-メルカプトエタノール、フェニルイソシアナ酸及びトリフルオロ酢酸を順次スポットすることによって行なう。

更に又、多孔質ガラスとして、 SiO_2 45～70 wt%、 B_2O_3 8～30 wt%、 CaO 8～25 wt%、 Al_2O_3 5～15 wt%、 Na_2O 3～8 wt%、 K_2O 1～5 wt%、 $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$ 4～13 wt%、 MgO 0～8 wt%、又は SiO_2 45～70 wt%、 B_2O_3 8～30 wt%、 CaO 8～25 wt%、 Al_2O_3 5～15 wt% なる組成を有するガラスを熱処理して B_2O_3 、 CaO を主体とする相を分相せしめ、この相を溶解除去することによって得られるものを使用する。

次に、本発明を更に具体的に説明する。

本発明者は、多孔質ガラス薄層 (多孔質ガラスシート) が化学的、機械的に安定であり、ガラスの多孔質体は TLC の固定相と担体を兼備する特徴を有し、従来の薄層のように表裏がなく、又細孔の表面積も大きく、ドライケミストリーに適している事実に着目し、多孔質ガラスシートの表面

で蛋白質等のエドマン分解、加水分解、ダンシル化 (DNS 化) 及び TLC を行なうならば微量の試料及び試薬で反応が進み、構造決定が可能であると考え、実験を行なった。

上記実験により、エドマン分解中に加水分解も同時に起り、N-端の AA 残基が遊離することが判明した。

この AA 残基を DNS 化し、そのまま多孔質ガラスシートを担体として用い、TLC を行なうことにより、AA 残基を分離固定できることができた。さらにエドマン分解を、試薬を繰返しスポットすることにより反覆して行なうことにより一個のシート上で N-端から 10 残基まで簡便迅速に分離できることが判明した。

本発明は、上記知見に基づく新たな提案である。次に、本発明の構成を更に詳述する。

多孔質ガラスシートとしては、厚み 0.2～2 mm、大きさ 2～10 cm×2～10 cm、細孔の平均直径 1,000～12,000 Å、望ましくは 3,000～8,000 Å のものを用いるのが適当である。

このようなシートは充分な機械的強度を有し、基板を用いて補強する必要はない。

このような多孔質ガラスとしては、分相性を有するガラスを使用して得られる多孔質ガラス、特に SiO_2 45～70 wt%、 B_2O_3 8～30 wt%、 CaO 8～25 wt%、 Al_2O_3 5～15 wt%、 Na_2O 3～8 wt%、 K_2O 1～5 wt%、 $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$ 4～13 wt%、 MgO 0～8 wt%、又は SiO_2 45～70 wt%、 B_2O_3 8～30 wt%、 CaO 8～25 wt%、 Al_2O_3 5～15 wt% なる組成（組成B）を有するガラス成形体を熱処理して B_2O_3 、 CaO を主体とする相を分相せしめ、この相を溶解除去することによって得られる多孔質ガラス（以下夫々多孔質ガラスA、Bと呼ぶ）を用いるのが適当である。

なお、多孔質ガラスシートはブロック状のガラス成形体を分相処理した後スライスし、得られたシートを酸処理することによって好適に製造することができる。

分相性を有するガラスとしては、組成A又は組

成Aを有する。そしてこのようにして生成した CaO 、 B_2O_3 を主成分とする相を溶解除去することによって多孔質ガラスが形成される。

B_2O_3 は上述の説明からも首肯しうるように細孔の大きさを決定する重要な因子であり、分相中に移行して除去される B_2O_3 量、或は逆に多孔硝子中に残存する B_2O_3 量は、細孔の径の均一性と密接な関係を有することが判明した。

上記組成を有する調合原料を熔融し、所望形状の成形体とする。成形体の製造方法に特に限定はなく常法を使用することができる。

なおバッチの熔融中に B_2O_3 の一部が揮発逸散するので、この逸散量を考慮してバッチ中の B_2O_3 量を定めることが必要である。

組成A又はBを有するガラス（以下本ガラスという）よりなる成形体を熱処理して CaO 、 B_2O_3 を主体とする相（以下 CaO 、 B_2O_3 層という）を分相せしめる。加熱処理温度が高い程、又熱処理時間が長い程 CaO 、 B_2O_3 相は大きくなる傾向を有し、熱処理条件を選択することによって細孔の

成Bのガラス（以下本ガラスと総称する）を使用するのが特に望ましく、耐圧性が大きく、機械的強度が大であり、又耐薬品性が大きく、 $\text{pH}0 \sim 14$ の範囲で使用可能であり、且つ孔径が均一であり、分離精度の大きい薄層クロマトグラフィーシートをうることができる。

なお組成Aのガラスは小孔の径が、 $3,000 \sim 100,000 \text{ \AA}$ の範囲の小孔の径が比較的大きい多孔質ガラスを得るために適し、又組成Bのガラスは小孔の径が数百～ $20,000 \text{ \AA}$ の小孔の径が比較的小さい多孔質ガラスを得るのに適している。

以下本ガラス並びに本ガラスを使用したシートの製造法について、更に詳細に説明する。

本ガラスの成分のうち SiO_2 は分相、除去工程によって得られる多孔硝子の骨格を形成するための基幹成分であり、 Al_2O_3 は補助成分として得られた多孔硝子の脆さを減少させる作用を有する。

B_2O_3 は一方において多孔硝子の骨格を形成する補助成分として機能するが、他方 CaO と協同して、熱処理によって微少な分相を生成する作用を

径を所望の値とすることができる。

本ガラスを使用するときは均一な大きさの細孔を形成させることができ、又処理条件、並びに組成の選択によりこの径を $50 \sim 100,000 \text{ \AA}$ の範囲とすることができるが、この径を $1,000 \sim 12,000 \text{ \AA}$ 、好ましくは $3,000 \sim 8,000 \text{ \AA}$ とすることにより特に好適な結果の得られることが判明した。加熱処理を行なった本ガラスよりなる成形体をスライスしてシート状となし次いでこのシートを HCl 、 H_2SO_4 、 HNO_3 等の酸中に浸漬して CaO 、 B_2O_3 相を溶解除去することにより本シートを得ることができる。なお酸処理を行なうに先立ち、 HF 溶液で短時間その表面をエッチング処理するのが望ましい。

前述したように熱処理の条件によって、得られる多孔硝子の細孔の径を制御することができるが、細孔の径は多孔質ガラス中に残存する B_2O_3 の量に応じて変化すること及びこの B_2O_3 の量は熱処理、酸処理の条件によって左右されることが判明した。そして B_2O_3 が望ましくは 0.5 wt\% 以

上残存するようこれらの条件を定めることにより多孔硝子を薄層クロマトグラフ用シートとして使用した場合、特に好適な結果の得られることが判明した。

望ましい処理条件は次の通りである。

加熱温度 600 ~ 850 °C

加熱時間 2 ~ 48hr、望ましくは12~48hr、

酸の種類 HCl、H₂SO₄、NH₃

酸の濃度 0.01~2.0 N、望ましくは

0.1 ~ 1.0 N

処理時間 2 ~ 20hr、望ましくは 4~16hr

温度 50~95°C、望ましくは80~90°C

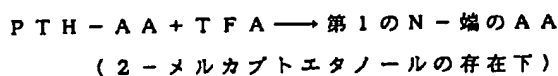
上記のようにして得られたシートを以下述べるように各種の蛋白質等の分析に使用する。

(a) このような多孔質ガラスシートの一辺に沿って、Nヶ所に試料をスポットする。試料は、1ヶ所当り30 pmol程度で充分である。スポット後、試料を乾燥する。

ドライヤを用いて風乾により乾燥することでもきるが、シートをポリエチレン等の袋で覆い、



次いで次の反応により第1のN-端のAAが遊離する。



2-メルカプトエタノールはエドマン分解をガラスシート上で短時間で行なわせるのに極めて有効である。又、PITCとTFAはこの順にスポットする必要がある、順序を逆とすると反応が進まない。

(c) 上記(b)の操作が完了した後、第1番目のスポットを除く、残りN-1個のスポットについて(b)と同じ操作を行なう。この操作によりN-1個のスポットにおいて第2のN-端のAAが遊離する。同時に第1のN-端のAAはPITC等と反応して、以下述べる展開の際スポットに寄与しなくなる。

(d) 第1番目、第2番目のスポットを除くN-2個のスポットについて、(b)と同じ操作を行なう。

ガス等を袋内に送り雄気的に乾燥するのが好ましく、TLCによって得られるスポットを鮮明ならしめる効果が得られる。

(b) 次いで、N個の点すべてに揮発性還元剤をスポットする。揮発性還元剤としては2-メルカプトエタノールが適当である。

2-メルカプトエタノールの作用は明らかでないが、蛋白質等の分解を促進する効果のあることが判明した。

2-メルカプトエタノールの量は900 mM程度で充分である。

次いで、PITC及びTFAをスポットし蛋白質等を分解する。

PITCは1.8 mM程度のピリジン溶液として用いるのが適当である。

PITCをスポットした後、TFAをスポットし、蛋白質等を分解する。

次の反応により蛋白質等の第1のN-端のAAが遊離しフェニルチオヒダントイン(PTH)-AAが生成する。

以下、順次スポットの数を1個ずつ減らして(b)の操作を繰返し、第i番のスポットについては(b)の操作をi回繰返す。この結果、第i番目のスポットでは第iのN-端となるAAが遊離される。

(e) ついで、DNS-Clの溶液をスポットし、次の反応によりDAN-AAを生成させる。



DNS-Clは90 pmol/0.1 μl程度のアセトン溶液として用いるのが好ましい。

なおこの際、緩衝剤、好ましくはトリメチルアミンのアセトン溶液をスポットするのが好ましく、より鮮明なスポットをうることができる。

i番目のスポットでは、第iのN-端のAAのDAN化物(ダンシルアミノ酸)が生成する。

(f) (e)の反応で生成したDAN-AAをクロロホルム等で展開し、UVランプを用いて2537nmの波長で照射し、蛍光によってAAを検出、固定する。

第i番目のスポットでは、第iのN-端となる

AAがDAN化物として検出される。iより小さい番号のN-端のAAは(c)で述べたように反応してスポットに寄与しない状態となっており、第i番のスポットでは第i番のN-端AAのみが検出される。

(作用)

多孔質ガラス薄層上に蛋白質或はポリペプチドをN個スポットし、第i番目($i=1\sim N$)のスポットでエドマン分解をi回行なって蛋白質或はポリペプチドを分解してアミノ酸を遊離させ、ついで全スポットでアミノ酸をダンシル化した後、上記ガラス上で展開を行ないアミノ酸をダンシル化クロライドとして検出することにより、N個のスポット上で、第1～N番のN-端のAAを、同時に精度よく分離、固定し、蛋白質等の一次構造の解析を行なう。

エドマン分解を2-メルカプトエタノール、フェニルイソシアナ酸及びトリフルオロ酢酸を順次スポットすることによって行なうことによりAAの遊離を効率的に短時間でこなわせる。

サイザー9305(島津製作所、京都)で測定し、4,400 Åであった。

上記シートを用い、構造既知のポリペプチドとしてリゾチームを用い、以下のような実験を行った。

リゾチームの0.3 mM水溶液(30 pmol/0.1 μl)を調製した。この液をガラスシートに10個スポットした。1 μキャピラリー(Drummond)を1/10に切断し、他方にゴム管を3 cmほどつけ、これで上記溶液を吸引し、排出することにより、上記溶液を0.1 μ1づつスポットした。

なお、以後のスポットを同様にして0.1 μ1づつ行なった。

上記シートをポリエチレンの袋で包み、N₂ガスを送って嫌氣的に乾燥した。

乾燥後、888 mM 2-メルカプトエタノールをスポットした。次に1.8 mM PITCのピリジン溶液、150 mM トリエチルアミン(1.5 mmol/0.1 μl) TFAの溶液をスポットし、エドマン分解を行なった。

多孔質ガラスとして、SiO₂ 45～70 wt%、B₂O₃ 8～30 wt%、CaO 8～25 wt%、Al₂O₃ 5～15 wt%、Na₂O 3～8 wt%、K₂O 1～5 wt%、Na₂O + K₂O 4～13 wt%、MgO 0～8 wt%、又はSiO₂ 45～70 wt%、B₂O₃ 8～30 wt%、CaO 8～25 wt%、Al₂O₃ 5～15 wt%なる組成を有するガラスを熱処理してB₂O₃、CaOを主体とする相を分相せしめ、この相を溶解除去することによって得られるものを使用することにより、ドライケミストリーの反応をスムーズに行なわせる。

(実施例)

SiO₂ 45～70 wt%、B₂O₃ 8～30 wt%、CaO 8～25 wt%、Al₂O₃ 5～15 wt%、Na₂O 3～8 wt%、K₂O 1～5 wt%、MgO 0～8 wt%なる組成を有するガラスをブロック状に成型し、600～800℃で20時間加熱し、5 cm×5 cm×0.5 mmのシートに切った。シートを1N HClに浸け、80～90℃で4～16時間加熱して、多孔質とした。孔径は水銀圧法により、島津ボア

上記エドマン分解を繰返えし、第i番目のスポットではi回のエドマン分解を行なった。

次に、上記トリメチルアミン溶液と0.9 mM DNS-C1のアセトン溶液(90 pmol/0.1 μl)をスポットした。これをクロロホルムで展開した。(所要時間10分間)DNS-AAは、UVランプ(Mineralight, San Gabriel, CA)の253.7 nmの波長で照射し、蛍光により検出した。

第1図は、このようにして得られたクロマトグラムであり、既知のリゾチームの構造と完全に一致した鮮明なスポットが得られた。

なお、図中LysはLysineを、ValはValineを、PheはPhenylalanineを、GlyはGlycineを、ArgはArginineを、CysはCystineを、GluはGlutamic Acidを、LeuはLeucineを、AlaはAlanineを示す。

分析に必要な時間は総計70分であった。

(発明の効果)

高価な装置、熟練を必要とすることなく、短時間で簡単に蛋白質等の一次構造を決定することが

できる。

又、必要な試料の量も少なく、30 pmol程度で充分である。

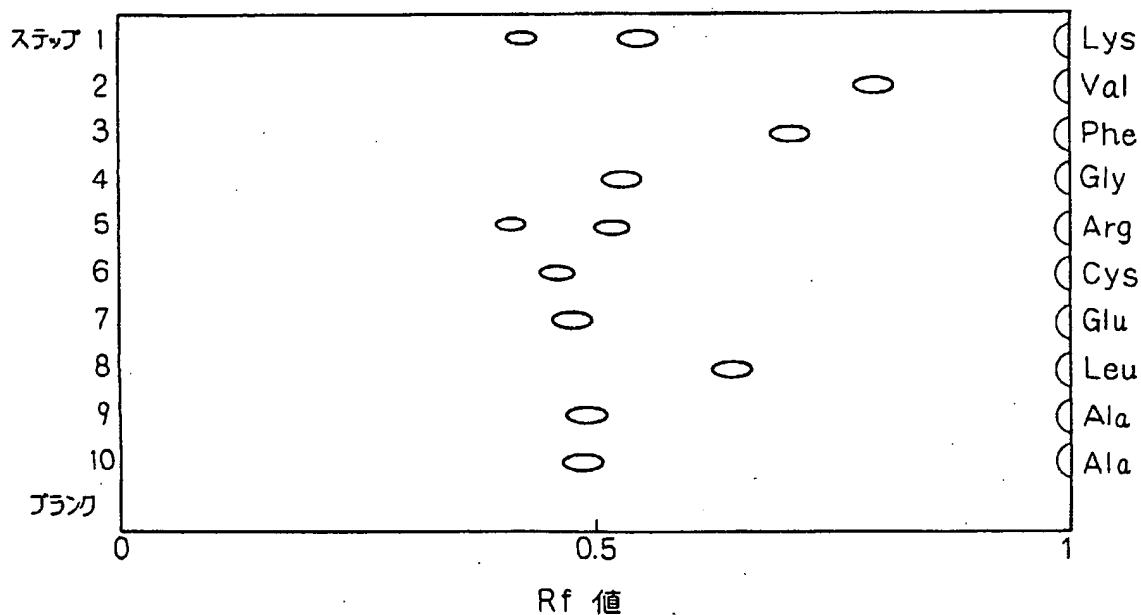
4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法によりリゾチームを分解して得られたクロマトグラムである。

特許出願人 伊勢化学工業株式会社
代理人 梅村 秀一 外 1 名



第1図



L8 ANSWER 12 OF 29 CAPLUS COPYRIGHT 2002 ACS

ACCESSION NUMBER: 1991:531400 CAPLUS

DOCUMENT NUMBER: 115:131400

TITLE: "A novel method for sequencing protein or polypeptide by TLC of amino acids released by modified Edman degradation"

INVENTOR(S): *Yoshioka, Masanori*

PATENT ASSIGNEE(S): Ise Chemical Industries Co., Ltd., Japan

SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.

CODEN: JKXXAF

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: Japanese

FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
------------	------	------	-----------------	------

-----	---	-----	-----	-----
-------	-----	-------	-------	-------

JP 03099264	A2	19910424	JP 1989-234724	19890912
--------------------	-----------	-----------------	-----------------------	-----------------

AB The title method comprises: (1) spotting N samples on a porous glass TLC plate; (2) hydrolyzing the Nth sample spot by the Edman reaction to degrade 1 peptide from the sample, hydrolyzing the unreacted (N-1)th sample and the reacted Nth sample by the same reaction to degrade 1 peptide from each sample, and repeating the degrdn. until sufficient samples are degraded; (3) dansylating and sepg. all the dansylated peptides by TLC on a glass plate; and (4) detg. the sequences of the sample protein or polypeptide. In Edman degrdn., 2-mercaptoethanol, Ph isothiocyanate and trifluoroacetic acid are added to the spotted samples. Sequencing of lysozyme is given as an example.